

Hypofysesvulster:

FAHIM LATIF
Stud med V-03.

Veileder:
Professor Jens Petter Berg

Innholdsfortegnelse

ABSTRACT:	3
INNLEDNING:	5
PROTEIN EKSTRAKSJON:	13
MÅLING AV PROTEINKONSENTRASJONEN:	15
2D GEL ELEKTROFORESE:	16
IEF:	17
SDS-PAGE:	18
1 X NUPAGE SDS RUNNING BUFFER:	20
COOMASSIE FARGING:	21
COOMASSIE FARGING:	21
METODE:	26
DECODON:	27
WESTERN BLOT:	30
DISKUSJON	34
RAF KINASE INHIBITORY PROTEIN (RKIP):	34
<i>NEURONSPESTIFIKK ENOLASE (NSE):</i>	35
BIBLIOGRAFI:	37

Abstract:

BACKGROUND:

Pituitary adenomas account for about 10 % of intracranial tumours. They cause morbidity by compression of regional structures or inappropriate secretion of pituitary hormones. Non-functional pituitary adenomas represent about 30 % of pituitary adenomas.

The patients experience growth and/or pubertal failure, headaches, visual disturbances or hypopituitarism from regional compression. Little is known of the oncogenesis of pituitary adenomas

The goal of this study was to detect interesting proteins which are highly expressed in patients with non-functional pituitary adenomas, and to explore them further on.

In this project we decided to take a further look at particularly two proteins, RKIP and NSE.

Raf kinase inhibitory protein: RKIP's ability to influence intracellular signalling cascades, cell cycle regulation, the suppression of metastasis, neurodegenerative processes, the modulation of emotions, and reproduction has made it an attractive research candidate for the last decade.

Neuron-specific enolase (NSE): Neuron-specific enolase is a substance that has been detected in patients with certain tumours, namely: neuroblastoma, small cell lung cancer, medullary thyroid cancer, carcinoid tumours, pancreatic endocrine tumours, and melanoma. Studies of NSE as a tumour marker have concentrated primarily on patients with neuroblastoma and small cell lung cancer.

We know that RKIP has an important role in suppressing metastasis of cancer in humans.

Our project tried to see if there was any correlation between NSE and

RKIP, so that we might use serum NSE to identify patients with a more aggressive non-functional pituitary adenoma.

METHODS:

This was done by running 2D-polyacrylamide gel-electrophoresis from samples taken from 18 patients with non-functional pituitary adenomas. Then we stained the gels with coomassie blue to detect the spots. All together 20 gel spots in gels from 2D-PAGE were sent to PROBE proteomic unit at university of Bergen for identification on their protein content.

This gel spots were taken from gels that had been stained with coomassie blue colour.

Finally we used the Decodon delta 2D program to analyse if there was any correlation between RKIP and NSE expression in the tumors. We also run all the same 18 samples with western blot, and then analysed the membranes, without seeing any clear correlation between these two proteins.

RESULTS:

The analysis with the Decodon delta 2D of coomassie blue stained polyacrylamide gels did not show any clear correlation between RKIP and NSE protein content of the tumors. Neither did the analysed membranes from western blot show any clear correlation between those two proteins.

CONCLUSIONS:

Despite of getting negative results, we found the RKIP protein so interesting that we decided to see if low adenoma levels of RKIP correlate to poor octreotide response in acromegaly.

The work of this project resulted in a publication in "The journal of clinical endocrinology & metabolism" (1.)

Innledning:

Hypofysesvulster representerer ca 10 % av alle intrakranielle svulster. De forårsaker sykdom ved inadekvat virkning/ekspresjon av hypofysehormoner, eller ved å komprimere nærliggende strukturer (2;). Funksjonelle hypofysesvulster kan bli klassifisert klinisk avhengig av hvilke hormoner de utskiller. Disse svulstene gir symptomer fordi de skiller ut hormoner, og de har mindre sannsynlighet for å bli store nok til å komprimere nærliggende strukturer enn de ikke-funksjonelle svulstene. Når det gjelder prolaktinomer hos menn er de funksjonelle, men symptomene på hyperprolaktinemi er ganske diffuse slik at de ofte ikke oppdages før svulsten er stor og trykker på nærliggende strukturer.

Veksthormonproduserende tumor, adrenokortikotropt hormon(ACTH)-produserende tumor og prolaktinproduserende tumor (prolaktinom) er de vanligste, dessuten finnes det TSH-produserende svulster som er mindre vanlige og forårsaker hypertyreose, disse kalles for funksjonelle svulster. Disse kan gi potensielt livstruende syndromer, som f.eks akromegali, Cushings sykdom og hyperprolaktinemi pga hypersekresjon. (3.). Prolaktinomer er de vanligste hypofysesvulstene og utgjør 39% etterfulgt av endokrint inaktive hypofysesvulster, veksthormonproduserende svulster og ACTH-produserende svulster. Etterhvert som hypofysesvulstene vokser fører destruksjon av normalt hypofysevev til betydelige hormonelle feil, ved at det skilles ut reduserte mengder med enkelte hormoner fra hypofysen. I enkelte tilfeller vil man i disse svulstene spontant få en blødning eller infarkt. Det trykket som de danner på nærliggende strukturer kan gi dobbeltsyn. Chiasma opticus ligger direkte ovenfor hypofysen og vekst proksimalt av hypofysesvulsten fører oftest til et progressiv synstap. Dette synstapet starter typisk fra hver side av synsfeltet og fører til tunnelsyn og senere blindhet. Hypofysesvulstene er saktevoksende, inkapslede svulster av epitelial opprinnelse som penetrerer nærliggende strukturer. Disse svulstene kan inneholde nektrotiske, cystiske eller hemoragiske områder. I sjeldne tilfeller kan de bli kalsifiserte. Insidensen til malign differensiering blant hypofysesvulster er svært lav.

Mikroskopisk består hypofysesvulstene av flere lag med celler i et fint og ordnet stroma.. Funksjonelle adenomer inneholder vanligvis granulerte celler av endokrin aktivitet. Vaskulær kompresjon ved sella turcica gir iskemi i svulsten og fører til nekrose og blødning. Dette kan forårsake en raskt ekspanderende tumormasse i sella turcica med påfølgende kompresjon av optikusnerven, hodepine og av og til meningeal irritasjon. De fleste adenomene utvikles fra hypofyseforlappen, og kan gi både systemiske og visuelle symptomer. Hypofysen ligger ca 8-13 mm distalt for chiasma opticum. Hypofysesvulstene kan komprimere de nasale retinale fibre som representerer temporale synsfelt i hvert øye. Proksimal vekst av hypofysesvulstene kan gi en innklemning av anteriore del av chiasma. Dette vil føre til en bitemporal hemianopsi. Siden tumorveksten vanligvis er asymmetrisk, vil tapet av synsfeltet også ofte være asymmetrisk. Hypofysesvulstene kan differensieres ved å måle størrelsen på svulstene. Mikroadenomer er definert som intrasellære adenomer som er opptil 1 cm store i diameter uten sellær forstørrelse som har liten effekt på det visuelle systemet og på funksjonen til kjertelen. Makroadenomer er større enn 1 cm i diameter med generalisert sellær forstørrelse og forårsaker symptomer på masseffekt (f.eks hodepine).

De endokrint inaktive hypofysesvulstene kalles også for ikke-hormonproduserende svulster fordi de ikke forårsaker klinisk hormonell hypersekresjon. Disse svulstene er vanligvis makroadenomer ved diagnosetidspunktet. Pasientene opplever ofte vekst og pubertetssvikt, hodepine, visuelle forstyrrelser eller forminsket normal hypofyse grunnet regional kompresjon. Selv om de klinisk sett mangler hormonell hypersekresjon, viser immunocytochemisk farging hormonell ekspresjon i minst 79% av disse svulstene. De refereres derfor som immunohistokjemisk positive (NF+). Resten av de ikke-hormonproduserende svulstene danner ingen hormoner og kalles derfor for immunohistokjemisk negative (NF-).(4.).

De ikke-funksjonelle adenomene er heterogene og de fleste av dem skiller ut gonadotropiner og deres subenheter, og gir dermed mistanke om å være av gonadotrop opprinnelse. Noen få av de kan være diskrete somatotrope eller kortikotrope adenomer basert på ultrastrukturell og immunhistokjemisk karakteristikk av veksthormonproduserende somatotropiner eller ACTH produserende kortikotropiner. Selv om de fleste av hypofysesvulstene er benigne, så er ca. 5-35% av dem lokalt invasive.

Noen av de er mer aggressive og vil infiltrere dura, bein og sinuser, mens andre (en betydelig mindre del) er maligne og vil metastasere til utenfor sentralnervesystemet. (4).

Hypofysesvulstene er monoklonale av opphav og dette har man klart å påvise vha molekylærgenetiske studier. (5.).

Noen få er del av et autosomalt dominant syndrom, kalt multippel endokrin neoplasie type 1 (MEN1), med mutasjon i tumor suppressorgenet *menin*. Andre viser tap av heterozygoti på kromosom 11q13 Mange ikke-funksjonelle adenomer har overuttrykk av epidermal vekstfaktorreseptor (epidermal growth factor receptor -EGFR), mens det i andre ikke er synlig engang. Ved påvirkning av EGFR vil de ikke-funksjonelle tumorene proliferere i kultur og oppregulere EGFR mRNA.

Disse funnene gir holdepunkter på at EGF og dets reseptor spiller en rolle i utvikling og forløp av de ikke-funksjonelle tumorene. Samtidig er det viktig å presisere at stordelen av onkogenesen til hypofysesvulstene fortsatt er ukjent.

Når det gjelder det kliniske bildet av hypofysesvulstene, så varierer det betydelig avhengig av lokalisasjon, størrelse og deres hormonproduserende egenskaper. Hypofysesvulstene blir ofte synlige i tidlig ungdom, og man har ingen sikker kjønnsforskjell. Hormonproduserende adenomer er vanligvis små og gir oftest ikke nevrologiske symptomer eller ”hypopituitarisme”(en tilstand hvor hypofysen ikke lager de nødvendige hormonene). Symptomene til de funksjonelle svulstene er relatert til de spesifikke hormonene de produserer. Nedenfor følger en oversikt over de vanligste funksjonelle hypofysesvulster.

Veksthormon produserende svulster:

Overproduksjon av veksthormon medfører karakteristiske kliniske bilder, avhengig av sykdomsdebut i forhold til biologisk alder. Dersom overproduksjonen inntreffer før lukking av epifyseskivene, utvikles gigantisme, mens sykdomsdebut etter avsluttet lengdevekst medfører akromegali. Dette er sjeldne sykdommer, med en insidens på 4 - 6 nye tilfeller per million innbyggere per år , altså 15 - 25 nye tilfeller årlig i Norge. Det kliniske bildet er oftest assosiert med sykdommen akromegali. Sykdommen er relatert til den kroniske overproduksjon av veksthormon . Hormonet virker anabolt, påvirker lipolysen og øker konverteringen av thyroxin (T4) til det metabolsk mer aktive triiodotyronin (T3). De fleste av kroppens celler uttrykker reseptorer for veksthormon og vekstfaktoren insulinliknende vekstfaktor 1 (IGF-1). Sistnevnte produseres blant annet i leveren, og produksjonen stimuleres av veksthormon. Serumnivået av IGF-1 avspeiler den integrerte veksthormonproduksjonen,

og referanseområdet for serum-IGF-1 følger den samme variasjon for kjønn og alder som veksthormon. Ved akromegali vil IGF-1-nivået være forhøyet eller i øvre del av normalområdet. Diagnosen akromegali stilles ikke ved bestemmelse av IGF-1. Serum-IGF-1 kan riktignok benyttes som screeningmarkør,

Begrepet akromegali henspiller på den akrale vekst, det vil si delvis reversibel bløtdelsfortykkelse av hender og føtter, kjeve-region, nese, ører, ligamenter (karpaltunnelsyndrom), tunge og svelg (søvnapné). Sykdommen medfører også periostale påleiringer og dermed ikke-reversibel fortykkelse av rørknoklene. Når pasienter med akromegali øker i skostørrelse, skyldes dette derfor primært en breddeforøkelse av føttene og ikke en lengdevest. Sannsynligvis er det den akrale vekst, og spesielt bløtdelshevelsen, som medfører at mange udiagnostiserte pasienter gjentatte ganger søker lege på grunn av smerte i hode, rygg og ekstremiteter. Bløtdelshevelsen medfører videre at fingrene blir stive og lite smidige.

Akromegali medfører en betydelig morbiditet. Videre er det påvist at sykdommen medfører økt mortalitet, relatert til kardiovaskulære sykdommer og kreftpasienter med akromegali har også økt forekomst av nervus medianus-kompresjon.

Standardbehandlingen ved akromegali er transsfenoidal operasjon med reseksjon av den veksthormonproduserende tumor. Inngrepet kan utføres med begrenset risiko, komplikasjonene er relativt få og ofte reversible eller korrigerbare. Somatostatinanaloger med lengre halveringstid (ca to timer etter subkutan injeksjon) har større veksthormonhemmende effekt og mindre uttalt insulinhemmende effekt enn genuint somatostatin. Medikamentell behandling med somatostatinanalog er kostbart, men bivirkningene er relativt beskjedne.

Prolaktinom:

Prolaktinom er den hyppigst forekommende av de hormonproduserende hypofysesvulstene. Prolaktinomen er oftest små, og hos kun et fåtall pasienter opptrer det større adenomer, såkalte makroadenomer. De er nesten alltid godartede. Symptomene forårsakes først og fremst av de økte prolaktinnivåene, som medfører endringer i reproduksjonen og i de seksuelle funksjoner.

Sekresjonen av prolaktin i hypofysen hemmes av dopamin. Alle prosesser eller medikamenter som hemmer sekresjon av dopamin i hypothalamus og transporten til hypofysen, kan derfor gi hyperprolaktinemi. Ikke-hormonproduserende hypofyseadenomer kan gi hyperprolaktinemi ved kompresjon av hypofysetilknen. Dette kan hemme den lokale transporten av dopamin fra hypothalamus til hypofysen. Dermed reduseres den hemmende

effekten av dopamin på hypofysens prolaktinproduksjon, og man får hyperprolaktinemi. Dette fenomenet kalles pseudoprolaktinomer.

Hyperprolaktinemi påvirker først og fremst gonadotropinproduksjonen og medfører hypogonadotrop hypogonadisme hos både menn og kvinner. Makroprolaktinomer som forårsaker lokal volumeffekt, og blant annet kan medføre synsfeltsutfall, er hyppigere hos menn enn hos kvinner. Dette skyldes nok at menn i større grad ignorerer symptomer på seksuell dysfunksjon (impotens og tap av libido). Prolaktinom kan gi osteoporose hos kvinner. Primærbehandlingen er medikamentell, såfremt dette ikke er kontraindisert, gir intolerable bivirkninger eller pasienten motsetter seg medikamentell behandling. Dopaminagonistene hemmer prolaktinsekresjonen ved å binde seg til og stimulere dopaminreseptorene. Ved transsfenoidal mikrokirurgisk reseksjon av mikroprolaktinomer kureres 70 %.

ACTH-produserende svulster:

Disse svulstene danner hormonet adrenokortikotrophormon (ACTH) som stimulerer dannelsen av glukokortikoider i binyrebarken.

Siden man har kortisolreseptorer i en rekke vev, finnes et mangfold av symptomer. Reseptorer i hjernen forklarer de nevropsykiatriske symptomer. Reseptorer i muskulatur forklarer muskelsvinn og den proksimale myopati. Nedsatt glukosetoleranse, diabetes mellitus og hyperlipidemi skyldes kortisoleffekter i muskler, fettvev og lever.

Sentral fedme er det vanligste symptomet. Atrofisk hud, striae og proksimal muskelsvakhet ser man sjelden ved andre tilstander. Tidlig osteoporoseutvikling gjør at diagnosen må mistenkes. Nevropsykiatriske problemer ses hos over halvparten av pasientene. Depresjon er særlig vanlig. Menn kan få redusert libido. Kvinner kan få menstruasjonsforstyrrelser og nedsatt fertilitet. Polycystisk ovarie-syndrom ses ofte. Ved ACTH-avhengig årsak til Cushings syndrom hos kvinner, vil ofte androgener være forhøyet, og de kan få hirsutisme. Man må mistenke binyrebarkkarsinom om kvinner viriliseres. Normalt har man høyst kortisolnivå rett før oppvåkning og lavest rett etter midnatt. Endringer i dette mønsteret er vanlig hos pasienter med Cushings syndrom, og er ofte den første biokjemiske endringen som kan påvises. kortisol i døgurnin, kortisol i spytt ved midnatt og kort deksametasonhemningstest er tester som benyttes.

Primærbehandlingen av Mb. Cushing ved ACTH-produserende hypofysesvulst er transsfenoidal hypofysekirurgi. Målet er å fjerne det ACTH-produserende adenomet uten å påføre pasienten hypofysesvikt. Etter operasjon må pasienten få substitusjonsbehandling med kortison

TSH-produserende svulster:

De mest sjeldne typer av hypofysesvulster er de TSH-produserende svulstene, som forårsaker hypertyreose. De kliniske manifestasjonene til hypertyreose inkluderer varmeintoleranse, svetting, slapphet, vekttap, irritabilitet, uro, søvnvansker, skjelving, dyspné, hjertebank, menstruasjonsforstyrrelser.

De diagnostiske testresultatene viser et forhøyet serumnivå av fritt T4 samtidig som man har et økt TSH nivå. Denne diagnosen er spesielt viktig pga potensielle operative komplikasjoner(arytmier) dersom pasienten ikke blir behandlet adekvat medikamentelt før kirurgisk behandling.

Betareseptorantagonister kan dempe eller kamuflere de vanlige symptomene. Hos eldre personer kan sykdommen være symptomfattig og domineres av et hovedsymptom, som f.eks. vekttap, ødemer eller atrieflimmer med eller uten hjertesvikt.

Hos *gravide* kan symptomene være vanskelige å tolke, da de ofte lett forveksles med symptomer som ofte oppstår i graviditeten. HCG-stimulering av thyreoidea forekommer og kan gi tolkningsproblem under graviditet

Pasienten bør behandles som nevnt tidligere med antityreotiske medikamenter for å redusere thyreoidea hormon produksjonen. Somatostatin analogene gir en meget effektiv medikamentell behandling som hemmer TSH produksjonen, hemmer tumorstørrelsen og reduserer thyreoidea hormon produksjonen. Somatostatin analog terapien er et veldig effektivt alternativ til kirurgi hos enkelte selekterte pasienter, særlig dersom det ikke er noe visuelle symptomer.

Dersom ingen sykdomsbedring etter kirurgi; bør man administrere et somatostatin analog for å forhindre konsekvensene av hypertyreose., redusere størrelsen på tumor og forhindre tumorvekst.

De generelle nevrologiske symptomene til hypofysesvulstene inkluderer hodepine, dobbeltsyn, tap av perifere synsfelt og senere blindhet, faciale smerter eller nummenhet.

Hypopituitarisme manifesterer seg som ved tap av energi, vekttap, kvalme og oppkast, obstipasjon, amenorrea og infertilitet, tørr hud, økt pigmentering av huden, kuldeintoleranse og mental status forandringer (f.eks økt søvnbehov, psykoser, kollaps etc)..

Noen svulster kan skille mer enn kun et hormon, f.eks. veksthormon og prolaktinom.

Sjeldne svulster skiller ut LH og FSH (gonadotropiner). Når hypofysesvulstene komprimerer de sekretoriske cellene, så er de første tegnene på cellulær feil vanligvis affeksjon av gonadotropiner. Derfor er bortfall av menstruasjon ofte det første tegnet på en hypofysesvulst hos kvinner, mens det hos menn ofte er impotens som er det første tegnet på hypofysesvulst.

Den kliniske diagnosen for hypofysesvulster er avhengig av symptomer og tegn som resultat av størrelsen på svulsten og/eller typen hormon som produseres. CT og MR er de billeddiagnostikkene som benyttes av for å påvise en hypofysesvulst. MR er dyrere enn CT, men er den mest foretrukkede billeddiagnostikken for kartlegging av hypofysen, fordi den forbedrer visualiseringen av bløtvev og vaskulære strukturer. Selv om MR er den mest foretrukkede billediagnostikken for kartlegging av hypofysestrukturer, spiller CT fortsatt en viktig rolle hos mange pasienter som ikke kan gjennomgå MR (MR er kontraindisert hos pasienter med pacemaker eller ferromagnetisk implantater i hjernen eller øyet.). CT er dessuten effektivt for bildetaking av kalsifisering, som er viktig som differensial diagnose. CT kan også bidra til preoperativ planlegging mht "pneumatization" og anatomien til sinus sphenoidalis.

Det er generelt tre muligheter som er tilgjengelige for behandling av hypofysesvulster

- Kirurgi
- Medikamentell behandling
- Strålebehandling.

Kirurgi:

Kirurgi for hypofysesvulster har vært tilgjengelig i over 100 år. Harvey Cushing bidro med utvikling til både transsphenoidal tilnærming og til teknikkene for transcranial kirurgi for hypofysesvulster. Idag regnes transsphenoidal tilnærming som den mest fortrukkede teknikken når hypofysekirurgi er indisert. Kirurgi er indisert når det er bevist at man har tumorvekst, særlig når det er assosiert med kompresjon av chiasma opticum, sinus cavernosum invasjon, eller hypofysehormon svikt. Etter behandlingen er forbedringen av visus dramatisk, særlig de første månedene. MR og perimetri blir brukt i postterapeutiske oppfølgingen.

Kirurgien har den fordelen at det raskt senker hormonnivåene. For mikroadenomene er helbredelsesraten mer enn 50%. Svulster større enn 1 cm kan kreve flere kirurgiske prosedyrer delt i flere trinn.

Selv om en nevrokirurgisk avdeling har et lite pasientvolum samlet sett, er det mulig for en kirurg å oppnå behandlingsresultater på nivå med større sentre, dersom denne kirurgen utfører alle operasjonene selv (ved at han/hun har tilegnet seg erfaring nok for disse operasjonene). (11).

Infeksjoner, cerebrospinalvæskelekasje, vaskulær skade, dobbeltsyn, synstap og hypofyseskade er sjeldne operative komplikasjoner.

Medikamentell terapi:

Medikamentelle behandlingsmuligheter for akromegali inkluderer bruk av dopaminagonist, som reduserer vekst hormon nivået. Men vanligvis ikke ned til normale nivåer.

Medikamentell behandling er førstevalget ved behandling av prolaktinomer (se over),.

Dopaminagonistene hemmer prolaktinsekresjonen.

Bromokriptin, en dopamin agonist er nyttig for å redusere størrelsen på prolaktinomer i hypofysen. Lav-dose bromokriptin kan opprettholdes for livet som livslang behandling.

Dersom medikamentet-terapien blir avbrutt, vil adenomet ofte vokse og på ny bli forstørret.

I ca 80-90% av pasientene, vil serum prolaktin nivåene normaliseres, og nesten 80% av svulstene vil skrumpe inn i størrelsen. De største risikoene ved bruk av bromokriptin er blødning i hypofysen. MR er ofte nyttig for å bekrefte komplikasjonen, når det mistenkes klinisk sett.

Strålebehandling:

Vekst i de ikke-funksjonelle hypofysesvulstene kan effektivt bli kontrollert med fraksjonert stråleterapi. Veksten blir stoppet i 70-90% av svulstene med en stråledose på 45 Gy gitt i 1.8-

Gy fraksjoner. Sjansen for en optisk nevropati og synstap er på 1%. Omtrent 50% av pasientene utvikler hypopituitarisme som krever erstatende hormon terapi. Kombinasjonen mellom kirurgi og strålebehandling virker å forbedre kontrollen på sykdoms progresjonen. Stråleterapi kan også kontrollere veksten av de fleste funksjonelle adenomer, men likevel er effekten mindre enn ved andre behandlingsalternativer ved funksjonelle hypofysesvulster.

Mindre enn 50% av pasientene med hormonproduserende svulster oppnår normale nivåer etter mange år. Bivirkninger av strålebehandlingen er: tretthet, hudreaksjoner, kvalme, hodepine, håravfall, redusert hukommelse og konsentrasjonsevne.

Strålekirurgi med gammakniv har de siste årene blitt mer populært fordi det gir en fokusert høydosebehandling av hypofysesvulstene, og forbedrer kontrollen av tumorveksten og hormonproduksjonen. Det blir primært brukt til behandling av mikroadenomer hos pasienter som ikke behøver dekompresjon av nervus opticus. Bildetaking er viktig for veiledning av denne type behandling, fordi et av kriteriene er at overflaten til tumoren bør være adskilt fra nervus opticus med minst noen få millimeter for å tillate effektiv dose til tumoren og en sikker dose til nervus opticus. Hos omtrent 90% av pasientene er tumorveksten kontrollert og hormonnivået er gradvis(over måneder til år) normalisert hos mer en 50%.

Protein ekstraksjon:

18 hypofyseadenomer fra pasienter operert på Nevrokirurgisk avdeling, Rikshospitalet ble benyttet. Disse ble videre frosset ned ved – 70 grader C frem til videre bruk.

Trizol-reagens fra Invitrogen ble brukt til å isolere proteinene fra hypofysesvulstene. Den tilsvarende isoleringen av RNA,DNA og proteiner fra prøver av humane vev, bakterier,virus, dyr og planter kan bli utført med Trizol Reagent som er et ” Klart til bruk Reagens”.(Invitrogen).

Trizol Reagent er den forbedrede versjonen av ”single-step” metoden for isolering av total RNA.(11.). Denne prosedyren kan isolere både små og store mengder RNA fra celle kulturer og vev. Dessuten kan et stort antall prøver bli utført samtidig, Trizol Reagent er en mono-fasisk løsning av phenol og guanidine thiocyanate som effektivt inhiberer RNase-aktivitet. Etter homogenisering av en vevsprøve i Trizol reagent, vil den homogeniserte prøven separeres i en organisk og en vannløselig fase ved tilførsel av kloroform og påfølgende sentrifugering.

RNA forblir primært i den vannløselige fasen, DNA vil forbli i interfasen, Proteiner vil forbli i den organiske fasen.(invitrogen).

Isopropylalkohol blir brukt til å presipitere den vannløselige fasen for oppsamling av RNA. DNA og proteiner i prøvene kan gradvis samles opp etter at den vannløselige fasen har blitt fjernet. (12.). DNA kan fjernes fra interfasen ved å tilsette etanol (Chomczynski, 1993), Mens et tilsvarende presipiteringssteg med aceton vil skille proteinene fra den organisk fasen.

All sentrifugering ble gjort med Hettich Zentrifugen. 1 ml Trizol reagent(invitrogen) ble brukt

til å homogenisere (ULTRA-TURRAX T25, Power homogenizer) 50-100 mg vev fra hypofyseadenomene. Denne homogeniseringen ble utført på is, dette for å holde homogenatet kaldt. Etter at vevet var spaltet godt, ble homogenatet inkubert i 5.min i romtemperatur. Kloroform ble tilført til blandingen med et totalt volum på 200mikroliter. Homogenatet ble godt Blandet og inkubert i 3 min i romtemperatur. Prøven ble sentrifugert ved 12000 pm x i 15 min ved 4 grader celcius. Etter sentrifugeringen ble mixturen separert i et vannløselig øvre lag og en phenolkloroform organisk fase(nedre laget). Den vannløselige fasen ble overført til et Eppendorf -rør for RNA-isolering. Annet vannløselig fase ble kastet for å få et rent phenol-kloroform organisk fase for DNA og proteinrensing. Den organiske fasen ble tilført 0,3 ml 100% etanol og mixturen ble godt blandet. Det ble videre inkubert i romtemperatur i 4 min og sentrifugert ved 2000 x i 5,min ved 4 grader Celcius. Mixturen besto nå av DNA pellet nederst i bunnen, mens proteinene holdt seg i phenol- Etanol supernatanten. Phenol-etanol supernatanten ble så overført inn til nye eppendorfrør for videre proteinekstraksjon, mens DNA pellet ble brukt til DNA ekstraksjon, 300 mikroliter av phenol-etanol supernatanten ble alikvotert i et mikrosentrifugerør. Proteinene ble presipitert ved å tilsette 900 mikroliter med acetone. Mixturen ble godt blandet i 15 sekunder for å oppnå en homogen løsning. Prøvene ble lagret i 10 min i romtemperatur og deretter ble de sentrifugert på 12000 x i 10 min ved 4 grader Celsius for å sedimentere proteinene. Etter sentrifugeringen ble phenol-etanol supernatanten kastet og proteinpelleten ble frigjort ved å tilsette 500 mikroliter av vaskeløsningen. Pellet ble frigjort ved bruk av en pipettespiss. Etter oppløsningen, ble pellet igjen vasket med 500 mikroliter av vaskeløsningen og oppbevart i 10,min i romtemperatur. Proteinene ble sedimentert ved 8000 x i 5.min ved 4 grader Celcius. Vaskeløsningen ble kastet og 2 nye vask ble utført med 1 ml hver av vaskeløsningene. Pellet ble frigjort ved vortexing(COMBI-Spin,FVL 2400 plus) for å effektivt fjerne alt gjenværende phenol. Den siste vasken ble utført med 1 ml av etanol bestående av 2,5% glycerol (v/v). Proteinpelleten ble igjen sentrifugert 8000 x i 5 min ved 4 grader Celcius på slutten av 10,min inkuberingen ved romtemperatur. Alkoholen ble kastet og røret ble invertert for å lufttørke proteinpellet i 10.min i romtemperatur. Etter at proteinet var lufttørket, ble 400 mikroliter av løsningen tilsatt for å løse protein pelleten. Volumet av den tilførte løsningen er avhengig av størrelsen på protein pellet(Invitrogen). Omtrent 0,2 ml av løsningen ble brukt til 10-20 mg av solid vevsprøve. Pellet ble forsiktig behandlet og løst opp i 20.min med vortexing(COMBI-spin,FVL 2400 plus).

Proteinet ble lagt på is og 4 mikroliter av den rensede proteinprøven ble tatt ut for protein konsentrasjonsmåling. Resten ble alikvotert i eppendorf rør og lagret i -70 grader Celsius fryseren for senere bruk.

Vaskeløsning:

0.3 M guanidine hydrochloride

95 % (v/v) ethanol

2.5 % (v/v) glycerol

Løsningsbuffer:

9 M urea

4 % CHAPS

30 mM Tris-HCl, pH 8.5

Måling av proteinkonsentrasjonen:

Bio-Rad protein assay ble brukt for å måle konsentrasjonen av det ekstraherte proteinet. Den er basert på metoden til Bradford. Målingen er rask og enkel. Det eneste man trenger for å kunne gjennomføre denne målingen er et "acidic dye" fargestoff til en proteinløsning, og deretter å måle ved 595 nm med et spektrofotometer. Verdiene relateres til en standardkurve for å få en nokså nøyaktig måling av proteinkonsentrasjonen (Bio-Rad). The Bio-Rad protein Assay er en "dye-Binding" assay pga fargeforandringene til en farge når det reagerer til forskjellige protein konsentrasjoner (Bradford, 1976). Basiske og aromatiske aminosyrer "residuerer", særlig arginin blir primært bundet av Coomassie blue dye (Compton and Jones, 1985).

Bovine serum albumin, Fraction V (Sigma) ble brukt til å lage en standardkurve. Sterilt vann ble brukt til å lage seks Bovine serum albumin (BSA) standard løsninger med disse følgende konsentrasjonene: 0, mg/ml, 0,15 mg/ml, 0, 3 mg/ml, 0,45 mg/ml, 0,6 mg/ml og 0,9 mg/ml. Disse seks BSA løsningene utgjorde sammen standardkurven og de ble analysert samtidig med prøvene. 800 mikroliter dH₂O og 20 mikroliter av en standard løsning ble tilsatt til en engangs-kyvette. To hundre mikroliter Dye reagent concentrate (Bio Rad Laboratories) ble også tilsatt til mixturen og stoffene ble deretter godt blandet. En blank løsning ble også lagd som en referanse prøve ved å tilsette 800 mikroliter dH₂O og 200 mikroliter Dye Reagent Concentrate (Bio Rad Laboratories) inn i en annen kyvette. Mixturen ble inkubert i 5.min ved romtemperatur. Konsentrasjonen til standard og den blanke løsningen ble målt ved 595 nm

med en UV/synlig spektrofotometer (Amersham Biosciences, Ultrospec 3300 pro). Hver av de rensede proteinprøvene ble målt ved å addere 800 mikroliter dH₂O inn i en kyvette med 4 mikroliter proteinprøve. Til slutt ble også 200 mikroliter Dye reagent concentrate (Bio Rad Laboratories) tilsatt mixturen og løsningen ble deretter blandet godt. En blank løsning ble også lagd som en referanseprøve ved å tilsette 800 mikroliter dH₂O og 200 mikroliter Dye Reagent Concentrate (Bio Rad Laboratories) inn i en annen kyvette. Mixturen ble inkubert i 5,min ved romtemperatur. Konsentrasjonen til de rensede proteinene og de blanke løsningene ble målt ved 595 nm med en UV/synlig spektrofotometer(Amersham biosciences, Ultrospec 3300 pro). Basert på standardkurven ble konsentrasjonen til protein prøvene og de blanke prøvene funnet. For å kunne få den riktige purifiserte protein konsentrasjonen, ble konsentrasjonen multiplisert med 5, siden det tilsatte volumet av standardløsningen ble 5 ganger høyere enn det purifiserte proteinprøvevolumet.

2D Gel Elektroforese:

2D gel elektroforese er en metode for separasjon og identifisering av proteiner i en prøve ved å skille dem i 2 dimensjonalt orienterte rette vinkeler i forhold til hverandre. Dette tillater prøven å skille seg over et større område, og øker resolusjonen til hver komponent.

2D gel elektroforese blir generelt sett brukt som et komponent til Proteomics, og er steget som blir brukt for isolering av proteiner for videre karakterisering ved hjelp av massespektrometri. I laboratoriet bruker vi denne teknikken hovedsakelig av to grunner. For det første for den store identifiseringen av alle proteiner i en prøve. Dette blir utført når man skal undersøke den globale proteinkspresjonen til en organisme eller til et vev, og blir best mulig utnyttet hos modellorganismer hvor deres genomer har blitt fullstendig sekvensert. På denne måten kan de individuelle proteinene bli bedre indentifisert med massespektrometridata. Den andre bruken av denne teknikken er til å undersøke differensiell ekspresjon, dette er når man sammenligner to eller flere prøver for å finne forskjeller i deres proteinkspresjon.

Isoelektrisk fokusering (IEF) blir brukt i den 1.dimensjonen. Denne separerer proteienene ut ifra deres ladning (pI).

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) i den 2.dimensjonen, denne separerer proteiner ut ifra deres størrelse(molekyl vekt, MW).

Disse prosedyrene er kjent som ISO-DALT, iso for isoelektrisk fokusering og dalt for dalton vekt.

IEF pH gradient kan bli generert ved å tilsette ampholytter til en akrylamid gel. Dette er en mikstur av amphoterisk art med et spekter av pI verdier. Ampholyter gir : en lik konduktivitet, høyere bufferkapasitet, løselig ved isoelektrisk punkt og minimum interaksjon med fokuserte proteiner. IEF pH gradienten kan også bli generert ved å bruke immobilisert gel. Disse er lik ampholytter men har blitt immobilisert inn i polyakrylamid gel, og produserer en immobilisert pH gradient eller IPG som ikke trenger å bli pre-fokusert. En pH 3-10 IPG strip vil vise oss større mengder av proteiner på et enkelt 2-D gel. Det er denne IPG typen som ble brukt i mine forsøk.

Grunnen til at man brukte slik Immobilisert pH gradient for IEF er at de er mer stabile ettersom gelen har en plastik bakdel og pH gradient er fiksert. Dette fører til en forbedring i reproduksjon av forsøk da de er mekanisk sterkere og pH gradient ikke avviker betraktlig. Siden stripsene kommer dehydrert, rehydrering først, bli brukt for å sette prøvene inn på gelen. Ulempene med IPG er at membran og hydrofobe proteiner kan dårligere bli representert i den 2. dimensjonen, dette er trolig pga protein/gel interaksjonen under IEF (16.). Noen store proteiner kan også gå tapt, trolig pga deres størrelse når proteinene blir satt på gelen. Det har også blitt foreslått at dette problemet kanskje blir forverret av rehydrering.

IEF:

Apparatet som ble brukt til kjøring av IEF ble grundig vasket og tørket før bruk.

Før appliseringen ble stripsene rehydrert med en rehydreringsløsning over natta.

Vi appliserte 125 mikroliter av urea tilsatt DTT (8, mikrogram DTT / 0,5 ml Urea) i brønnen før stripsene ble lagt i brønnen med gelsiden ned, og med anionsiden av stripsen mot anionsiden av brønnen. Vi passet godt på at det ikke kom noen bobler under stripsen. Deretter satte man på litt olje på toppen av stripsene, ca 0,5-1, ml. Stripsene ble deretter lagt til rehydrering over natta i IEF apparatet.

Neste dag lagde vi ferdig prøveløsningen som skulle appliseres under stripsene. Vi fjernet først Plastbitene fra stripsene, deretter pipeterte vi prøveløsningen 21 mikroliter (en blanding av bufferløsningen og prøvematerialet) under stripsene på den ene siden av stripsen.

Kjøringen av IEF i IPG systemet blir konduktert ved svært høy spenning (opp mot 8000 V) og svært lav strøm (vanligvis mindre enn 50 mikroAmpere per IPG-strip) grunnet den lave

ioniske styrken i IPG stripsene. Under IEF reduseres strømmen mens spenningen øker ettersom proteiner og andre ladede komponenter migrerer til deres ekvibreringspunkt.

Vi satte stripsene i hver deres brønn, la forsiktig noen pads under sikkerhetselektrodene for å sikre kontakt mellom elektrodene og elektrode områdene, lukket igjen IEF apparatet og startet deretter IEF. Ettersom IEF kjøres, vil "Bromophenol blue tracking" migrere mot anode. Dersom fargen ikke migrerer, har vi ingen flyt av elektrisitet.

Etter endt kjøring av IEF tok vi ut stripsene, la dem i noen 10.ml plastrør med lokk og satte dem i fryseren -80 grader inntil videre bruk.

SDS-PAGE:

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE er en elektroforese metode for å separere polypeptider etter deres molekylvekt(mW). Teknikken blir brukt i polyakrylamid geler bestående av sodium dodecyl sulphate(SDS). SDS er en anionisk detergent som denaturerer proteiner ved pakking (wrapping) rundt polypeptid bakbeinet i en ratio av omtrent 1,4 gram SDS per gram protein.

Før starten på 2.dimensjonen:

Fortynnet vi en 4x NuPage LDS sample buffer $\frac{1}{4}$ med destilert H₂O. Vi brukte 2,ml 4x buffer + 6.ml destilert H₂O= 1x Sample buffer(SB).

Vi lagde ferdig noen løsninger som skulle brukes senere, dette var:

Løsning 1: 2,25.ml 1x SB + 250 mikroliter Reducing agent.

Løsning 2: 2,5.ml 1x SB i en flaske Alkylating reagent.

Start Prosedyre:

1. Stripsene ble tatt ut av fryseren og tint i noen min. Deretter ble IPG stripsene inkubert i 2,5.ml Reducing agent(løsning 1). I 15,min i romtemperatur(på vippe). Mens stripsene vippes i løsningen for 15,min gjør man istand gelene og bufferkammeret for SDS kjøring(prosedyre lenger ned på siden). Etter 15,min heller man deretter ut løsningen.

2. Tilsetter 2,5 ml alkylating reagent (løsning 2) til IPG stripsen. Inkuberer i 15,min romtemperatur. I mellomtiden gjør man istand en Agaroseløsning 0,5% i running buffer(0,20 g Agarose + 40 ml runningbuffer),som skal brukes senere. Etter 15, min med inkubering over vippe i romtemperatur heller man ut løsningen..

Zoom geler ble brukt til 2D analyse av proteiner som følger IEF av 7,0 cm IPG strips.

Disse Zoom gelene inneholder en IPG brønn som er designet for å passe til 7,0 cm IPG strips, og en molekylvekt markør brønn

Videre Prosedyre:

1. Ta ut gelene fra pakken, fjern tapen nederst på gelen, dra forsiktig ut plastkammen øverst på gelen.
2. Legg gelene inntil bufferplatene og plasser platene inn i kammeret.
3. Sørg for å legge gelene inntil bufferplatene på en slik måte at den korte siden av gelen peker inn mot midten av kammeret.
4. Lås gelene mot platene vha en ”plastklemmer”
5. Kutt plastikkendene på IPG stripsen. Plasser IPG stripsene på gelen og tilsett ca. 400 mikroliter Agaroseløsning over IPG-stripsene, og vent til det stivner.
5. Fyll det indre bufferkammeret med 1x runningbuffer løsning(ca. 200 ml), Sørg for at brønnen er full med runningbuffer og at man ikke har noen luftbobler tilstede i brønnen.
6. Sjekk etter en evt lekkasje fra det indre til det ytterste buffer kammeret. Ved en evt lekkasje så gjentar man steg 4-6 igjen.
7. Fyll det ytterste bufferkammeret med 1x runningbuffer løsning(omtrent 600 ml).
8. Lukk deretter igjen lokket på bufferkammeret. Sørg for at den negative elektroden er knyttet til riktig ledning og den positive til sin respektive ledning.
9. sett elektrode ledningene i apparatet.
10. Slå på apparatet og kjør gelene på 200 v for ca 60,min
11. Når kjøringen er fullført (fargefronten er hele nede ved bunnen), slår man av apparatet, tar av ledningene og fjerner gelene fra bufferplatene.
12. Ta av plasten fra gelen og farg dem med coomassie farging.

1 X NuPAGE SDS Running buffer:

50 ml NuPAGE MOPS SDS Running buffer (20 X, Invitrogen)

950 ml dH₂O

Bland godt

Step one:



Step two:



Step three:



Coomassie farging:

Commassie løsninger:

Fikseringsløsning:

Etanol 400 ml

Acetylsalicylsyre 100 ml

500 ml destillert H₂O.

Avfargingsløsning:

Etanol 250 ml

Acetylsalicylsyre 80 ml

670 ml Destillert H₂O.

Fargeløsning:

PhastGel Blue R. 1 tablett, løses opp i 400 ml avfargingsløsning.

Varm opp til 60 grader Celsius og filtrer før bruk.

Stabiliseringsløsning(Preserving solution):

Glycerol (87%w/v) 25 ml

Avfargingsløsning 225 ml.

Coomassie farging:

Prosedyre:

- 1.) Straks etter endt elektroforese legges gelen i en boks med fikseringsløsning i 30,min over en vippe.
- 2.) Farg gelen i 10,min fargeløsningen som er blitt varmet opp til 60 grader Celsius på forhånd, dekk boksen.
- 3.) Skyll gelen en gang i destillert vann.

4.) Avfarg gelen ved å bruke avfargingsløsning i 5 min x flere over vippe. Bytt avfargingsløsningen opptil flere ganger til de fargede proteinbåndene blir klart synlige mot bakgrunnen.

5.) Legg gelen i en boks med stabiliseringsløsning (preserving solution) i 30 min. Gelen legges videre i scanner eller kamera og bilder taes for videre bruk med Decodon programmet.

Etter å ha tatt bilder av gelene tok vi utgangspunkt i den ene gelen(prøve nr 210) og skar ut 20 proteiner som ble synlige i gelen etter farging med coomassie.

Bakgrunn

Tilsammen 20 gelbiter fra 2D-PAGE ble sendt PROBE Proteomic unit ved universitetet i Bergen for identifisering av protein innhold. Gelbitene var farget med Coomassie Blue. Samtlige prøver var merket som vist i Tabell 1.



(Fig av gelen som vi skar disse gelbitene ut av.)

Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) ble benyttet ved PMF-søket i NCBIInr..

Tabell 1: Beskrivelse av de 20 Coomassie fargede gelbitene fra 2D-PAGE

Prøve nr.	Navn	Accession nr.	Masse (kDa) / pI	Protein (signifikant(e) treff)
1	1	gi 16974825	8483 / 3.9	Chain A, Solution Structure Of Calcium-Calmodulin N-Terminal Domain
2	2	gi 17390171	17479 / 5.4	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit, precursor [Homo sapiens]
3	3	gi 7019519	27413 / 6.2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor precursor [Homo sapiens]
4	4	gi 14250401	41321 / 5.6	actin, beta [Homo sapiens]
5	5	gi 31165	47581 / 4.9	human gamma enolase [Homo sapiens]
6	6	gi 16741373	56525 / 5.3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide [Homo sapiens]
7	7	gi 6996447	61187 / 5.7	chaperonin 60, Hsp60 [Homo sapiens]
8	8	gi 6900104	72402 / 5.1	glucose-regulated protein [Homo sapiens]
9	9	gi 57085907	71082 / 5.4	PREDICTED: similar to Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) isoform 1 [Canis familiaris]
gi 62896815		53580 / 5.6	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant [Homo sapiens]	

10	10	gi 55669910	67174 / 5.6	Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module Complexed With Human Serum Albumin
11	11	gi 15277488	46915 / 6.5	IDH1 protein [Homo sapiens]
gi 31873324		46783 / 6.8		hypothetical protein [Homo sapiens]
12	12	gi 55957148	86113 / 7.4	OTTHUMP00000042146 [Homo sapiens]
gi 20072188		86252 / 7.6		Aconitase 2, precursor [Homo sapiens]

Prøve nr.	Navn	Accession nr.	Masse (kDa) / pI	Protein (signifikant(e) treff)
13	13	gi 999580	28792 / 6.6	Carbonic Anhydrase I (Carbonate Dehydratase I, Hca I) (E.C.4.2.1.1) Complexed With Mercuric Chloride
gi 14719798		28797 / 6.9		Chain B, Solution Structure Of The Cai Michigan 1 Variant
gi 515109		28778 / 6.6		Drug-Protein Interactions: Structure Of Sulfonamide Drug Complexed With Human Carbonic Anhydrase I
gi 230445		28903 / 6.4		Carbonic Anhydrase Form B (Carbonate Dehydratase) (E.C.4.2.1.1)
gi 20380766		28909 / 6.6		CA1 protein [Homo sapiens]
14	14	gi 4261934	15954 / 8.8	neuropolypeptide h3 [Homo sapiens]
15	15	gi 4261934	16068 / 8.8	neuropolypeptide h3 [Homo sapiens]
16	16	gi 6003532	14069 / 6.5	hemoglobin beta subunit variant [Homo sapiens]

17	17	gi 58177614	15190 / 8.7	Chain C, T-To-T(High) Quaternary Transitions In Human Hemoglobin: Alphay140f Oxy (2mm lhp, 20% Peg) (1 Test Set)
18	18			Mixture of gi 67464046 + gi 73976108
gi 67464046		36483 / 8.6		Chain Q, Crsytal Structure Of Human Liver Gapdh
gi 73976108		36041 / 8.7		PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2 isoform 15 [Canis familiaris]
19	19			Ingen signifikante treff
20	20			Ingen signifikante treff

MS og MSMS av utvalgte peptider resulterte i signifikante treff på samtlige prøver, med unntak av prøve 19 og 20, Tabell 2. Masse og pI stemmer relativt bra med eksperimentelle verdier (Tabell 1).

Metode:

1. Reduksjon og alkylering (Cys):

-S-S- broer ble brutt (Cys) med DTT (DiThioTreitol fra Amersham Biosciences, #171318-02) og Cys alkylert med Iodoacetamid (Sigma Aldrich, I-6125) for å hindre oksydering og nye brodannelse.

2. Opptygging med protease i gel (peptidfingeravtrykk):

Trypsin Porsine fra Promega (#V 511A) ble benyttet som protease, da denne er ideell for PMF-søk i databaser.

3. Ekstrahering av peptider:

Ekstrahering med fortynnet TFA (trifluoroacetic acid) og Acetonitrill (CH_3CN).

4. Oppkonsentrering/desalting av prøve;

Samtlige prøver ble applisert sammen med matrix (CHCA, α -cyano-4- hydroxycinnamic acid) på en 600 μm AnchorTarget fra Bruker Daltonic GmbH (part # 209513) som dried droplet (se Anchor chip manual Rev. 2.3: <http://www.bdal.de/care/>) samt vasket og rekrySTALLISERT. I tillegg ble prøvene merket 1, 2, 3, 5, 13, 14, 15, 18, 19 og 20 også desaltet/oppkonsentrert med C18 μ -ZipTip kolonner fra Millipore. Prøvene ble applisert på 600 μm AnchorTarget med CHCA.

5. Massespektrometrisk analyse;

Prøvene ble analysert på MALDI-ToF (*Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight*; ultraflex ToF/ToF fra BRUKER Daltonic GmbH).

En peptid kalibreringsstandard nr. 206195 fra BRUKER Daltonic GmbH (Leipzig, Tyskland) ble benyttet til kalibrering av masseskalaen. Peptidene dekker masseområdet mellom 1046,5 og 3147,5.

6. PMF-søk i Mascot (NCBIInr);

Massespekteret av tryptiske peptider ekstrahert fra gelbitene ble sammenlignet med det teoretiske trypsinat av proteiner i NCBIInr databasen.

7. MS/MS av utvalgte peptider;

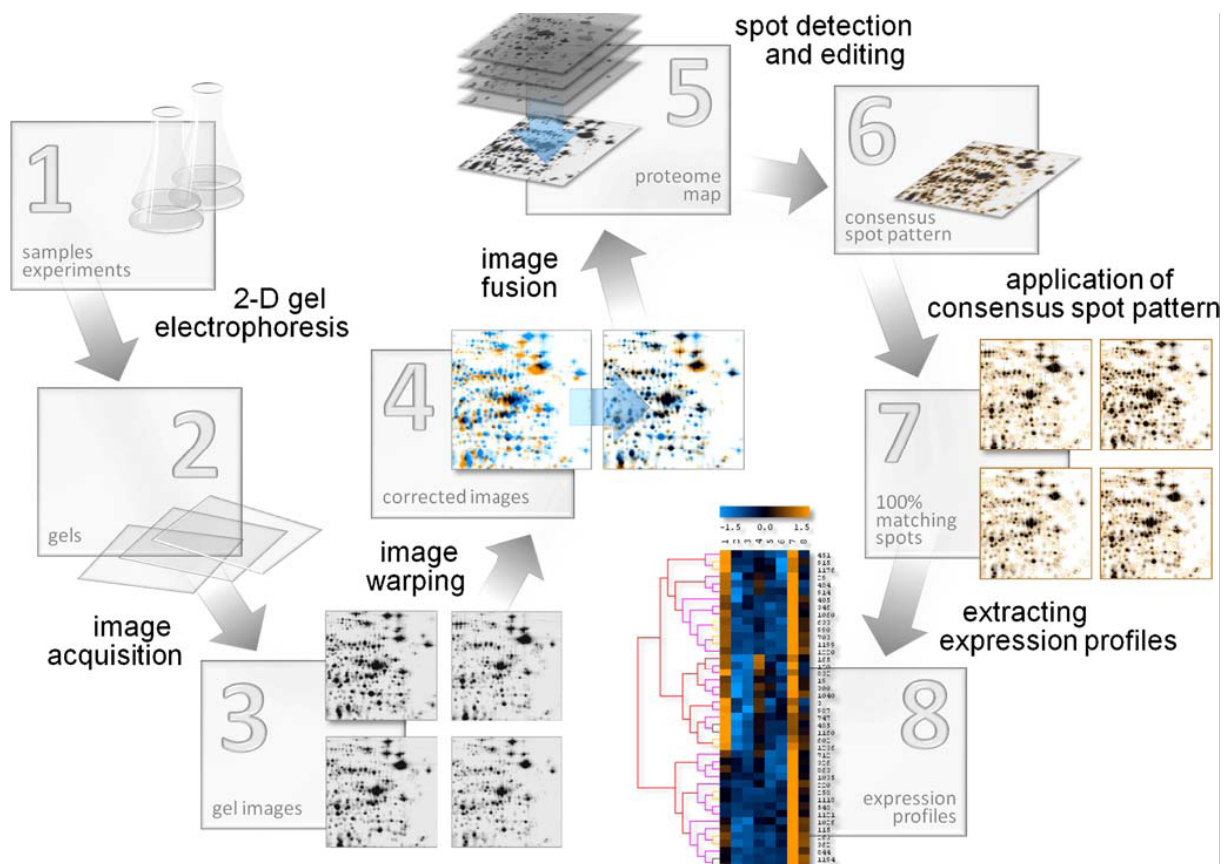
I samtlige prøver ble to peptider valgt ut for MS/MS-analyse. MS/MS-spektrene eller psd-spektrene (*Post Source Decay*) ble kombinert med massespektret av peptidblandingen og benyttet i Mascot-søk (NCBIInr).

Decodon:

Decodon programmet ble brukt for analysering etter at man hadde tatt bilder av gelene som var farget med coomassie farging.

Bildene ble senere lagt inn på maskinen og videre overført til decodon programmet.

1. Etter at bildene var lagt inn på decodon programmet korrigerer vi for spot variasjonen ved å korrigere bildene for ulik vandring av proteiner i de forskjellige eksperimentene, da 2D-elektroforese resulterer i variasjoner i spot-posisjonen ved kjøring.
2. Bilde fusjonering og proteom kart samlet sammen informasjonen til hele eksperimentet inn i et fusjonert bilde, også kalt et proteom kart (proteome map). Dette proteom kartet inneholder informasjon om alle protein spotene som var blitt identifisert i dette eksperimentet.
3. Spot-identifiseringen ble utført på proteom kartet. Som et resultat ble et konsensus spot mønster dannet som var gyldig for alle gelene i dette eksperimentet. Det beskrev posisjonen og den generelle formen til alle protein-spotene i dette eksperimentet.
4. For spot-kvantiteringen og dannelse av ekspresjonprofilene ble konsensus spotmønsteret applisert til alle gelbildene i eksperimentet. Bilde transformeringen forsikret at alle spotene i konsensusmønsteret havnet i riktig posisjon til de andre gelbildene. Et remodelleringssteg sørget for at spot-grensene ble adaptert på riktig plass i de utvalgte bildene. Alle spotene i konsensusmønsteret ble funnet i hver eneste gel.
5. Ekspresjonsprofil-analysen identifiserte spot som vi på forhånd hadde valgt ut som interessante og de ble markert for videre analyse, protein identifikasjon og avlesing.



(Berth , Moser & Kolbe... 2007)

Western blot blir brukt til å detektere tilstedeværelsen av et spesifikt protein i en kompleks protein-mikstur, og til å få frem kvalitativt og kvantitativt data til et protein av interesse.

(Pierce; Promega).

Etter gel-elektroforese blir proteinene overført fra gelen til en nitrocellulose eller PVDF membran. Ledige områder på membranen blir blokket med et blokkingsbuffer for å forhindre ikke-spesifikke bindinger(Promega). Enten blir et merket primært antistoff som gjenkjenner det spesifikke proteinet tilsatt på membranfilteret(direkte detekesjon) eller så blir et merket sekundært antistoff (indirekte deteksjon) som binder primær antistoffet tilsatt til slutt. (Pierce; MILLIPORE). Sekundære antistoffer som er bundet til enzymer som (horseradish peroxidase (HRP)) eller alkalisk fosfatase (AP) blir brukt i immunodetektering. Promega; Pierce; MILLIPORE)

Western Blot:

Western Blot er en teknikk som innebærer at proteiner som først separeres ved elektroforese, blir overført til et filter. Deretter kan man bruke flere metoder for å påvise de immobiliserte proteinene. Når man benytter antistoffer for å påvise proteinene kalles det immunoblotting. Standard. fremgangsmåte begynner med en gelelektroforese, deretter blir proteinene overført elektroforetisk til en nitrocellulose- eller polyvinylidfluorid (PVDF)-membran. Styrken i bindingskapasiteten til membranene er en viktig parameter. Dersom man skal bruke membranen til sekvensering av et protein, kreves sterk binding og høy bindingskapasitet. For preparative formål og immunoblotting ønsker man membraner som ikke binder så sterkt, da det vil redusere problemer med bakgrunnsfarging

En immunoblottingsprosedyre kan deles i seks trinn: 1) preparering av antigen, 2) separering av antigene komponenter ved gelelektroforese, 3) overføring av separerte polypeptider til membran, 4) blokkering av membran med irrelevant protein for å unngå uspesifikk binding, 5) tilsetning av primære- og sekundærantistoff og til slutt 6) detekteringstrinnet .

Valg av antistoff: Polyklonale antistoff vil stort sett inneholde antistoffer som reagerer med mange forskjellige områder på det aktuelle antigenet. Monoklonale antistoffer vil vanligvis bare fungere ved immunoblotting dersom området som gjenkjennes består av en sammenhengende sekvens av aminosyrer . Det er tre typer av substrater som er spesielt brukt; Kromogen, kjemoluminiscens og fluorescens. Ved kromogen deteksjon katalyserer det konjugerte enzymet en reaksjon for å danne en uløselig farget presipitat, mens synlig lys blir produsert i kjemoluminiscens deteksjon. Kjemoluminiscens har i tillegg muligheten til å reprobe membranen flere ganger. (Millipore). Lysutgangen i kjemoluminiscens deteksjonen kan bli fanget opp ved bruk av film og et CCD camera.

Enten et fluorkonjugert antistoff eller fluor substrate blir brukt i fluorescent deteksjon.

Fordelen med denne prosedyren er at fluorescent signalene er stabile og spoten kan bli lagret og re-analysert.

Uansett hvilket substrat som blir brukt vil intensiteten til signalet korrelere med mengden av proteinet på membranfilteret(Pierce).

Overføring av proteiner fra gel til membran:

Overføringen kan skje på tre måter; 1) ved enkel diffusjon, 2) ved hjelp av vakum, 3) elektroforetisk. Elektroforetisk har flest fordeler for de fleste formål, best hastighet og relativ fullstendig overføring av de ønskede proteinene.

Blokkering av uspesifikk binding:

Det finnes flere gode blokkingsmidler: fettfri tørrmelk, tween 20, BSA (IgG fri), gelantin eller hesteserum. Disse brukes i forskjellige konsentrasjoner og kombinasjoner. Man bør ikke bruke kraftigere blokkering enn nødvendig, da spesifikke signaler kan svekkes av blokkingsmidlene [19].

Inkubering med antistoff:

Det kan være nødvendig å fortynne antistoffet i blokkeringsmiddel. Inkuberingen bør skje minst en time, i mange situasjoner vil man få økt sensitivitet ved å forlenge inkubasjonen over natten på kjølerom.

Prosedyren som ble brukt av meg:

1. Elektroforese:

Setter på varmeblokka, 95 varmegrader.

Forberedet deretter prøvene, proteinene ble tint og blandet.

Prøve:

- protein x mikroliter
- dest vann x mikroliter
- 4x NuPage samplebuffer 7 mikroliter
- NuPage reducing Agent 3 mikroliter
- Totalt mengde = 27,5 mikroliter.

Prøvene varmes opp v/95 varmegrader for 5, min.

Markøren Magic Mark Western standard 5 mikroliter varmes også opp samtidig.

Gjør klar gelene (tar av hvit tape, fjerner plastkam), setter gelene i elektroforese bufferkammeret, med høy kant stikkende ut.

Fyller indre bufferkammer med 1 x runningbuffer (50 ml 20 x buffer, 950 ml dest vann) til over brønnene (ca 200 ml), sjekker deretter at det ikke er noe lekkasje.

Fyller ytre bufferkammer (også med 1 x runningbuffer) nesten like langt opp (ca 600 ml)

Prøvene appliseres i hver sin brønn med lang pipettespiss- 20 ml tilsettes.

Starter i venstre brønn, og tilsetter markør til slutt.

Setter på lokk med ledninger- 200 V til markøren har vandret helt ned (ca. 50-60, min).

2. Blotting.

Bruker PVDF membran

Transfer buffer:

- NuPage Transfer buffer (20 x) 50ml
- Metanol 200 ml
- Dest vann 750 ml
- Totalt mengde 1000 ml.

Bløter Blottingspads (5 stk) i transferbuffer- fjerner luftbobler.

Filterpapir (4 stk til 2 geler) legges i karet med transferbuffer kortere tid før de skal brukes. (8,5x7,5.cm).

Membranen legges i metanol i 30 sek, så over i transferbuffer i 10.min. Klipper av et hjørne, evt merk ned (proteinsiden) med et lite blyantmerke.

Når elektroforesen er ferdig: helles væsken ut.

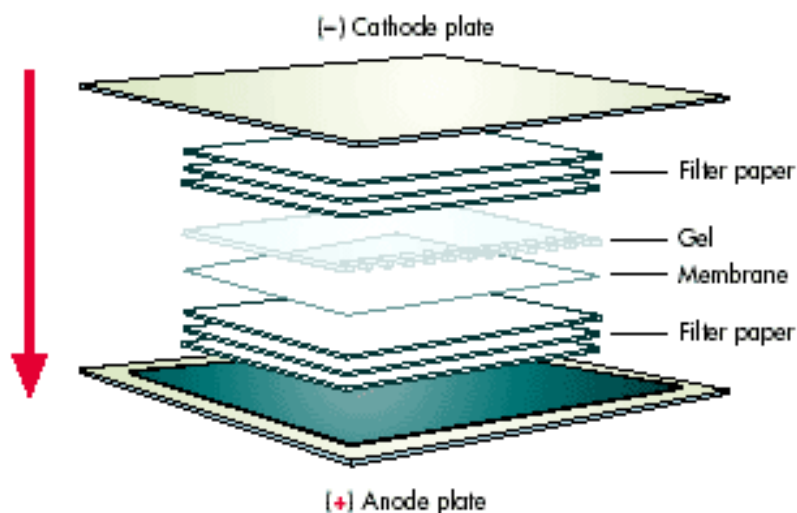
Legger gelkammeret med brønnsiden opp, åpner deretter opp med en kniv. Skjærer av brønnene. Klipper et lite hjørne av for å merke ved prøve nr 1(nå på høyre side).

Løsner gelen, skjærer av nederste kant etterpå. Legger på filterpapir, fjerner luftbobler. Snur dette over på en av sidene fra gelkammeret. Legger på membranen(avklipte hjørner mot hverandre).

Legger lagvis i blottingskammeret:

Fra øverst mot nederst:

- 3 svamper
- Filterpapir
- Membran
- Gel
- Filterpapir
- 2 Svamper



En enkel figur av western blot sandwich.

Pakker inn i bufferkammeret. Transferbuffer i det innerste kammeret og destillert vann i det ytterste. Setter på lokk og kobler ledningene til apparatet. Kjører deretter på 35 Volt for ca 50-60,min.

Mens apparatet ble kjørt lager man ferdig 50 ml TBST med 5% tørrmelk (2,5 gram i 50 ml TBST).

3.Blokking:

Etter endt kjøring heller man ut væsken. Tar ut membranen, puttes med proteinsiden opp i hver sin merkede boks. Skyller deretter med litt 1 x TBST-buffer.

Heller på blokke-væske: 50 ml TBST med 5% tørrmelk (2,5 gram i 50 ml TBST).

Legges på vippe i romtemperatur i 2 timer.

4.Inkubering med Antistoff:

Lager ferdig 10 ml TBST med 2,5% tørrmelk(0,25gram i 10,ml Tørrmelk).

Like før blokkingen er ferdig tilsettes primærantistoffet i ønsket fortynning, eks. Vi brukte 5 mikroliter primært antistoff(anti-RKIP/anti-NSE), dvs fortynning 1/2000 mens det ble brukt 1 mikroliter primært antistoff av (anti-Aktin) i 10 ml 2,5% tørrmelk. Dvs fortynning 1/10000. Dette ble inkubert i enten små plastbokser som hadde passe størrelse ift membranen eller i plastposer. Ved bruk av plastposer var det imidlertid viktig at man ikke fikk noen luftbobler. Disse membranene ble videre satt på vippe i kjølerommet over natta.

Neste dag startet man med å vaske membranene 3-5 x i TBST-buffer for 10.min på vippe. Når dette var gjort inkuberte vi membranene med sekundær antistoff.(anti-goat/anti-rabbit/anti-mus), i fortynningen 1/10000, dvs 1 mikroliter på 10 ml TBST 2,5% tørrmelk på vippe i 1.time.

Etter at timen var gått vasket vi membranen i TBST-buffer 3-5 ganger i 10 min.

Etter at vaskingen var utført tok vi ut kjemoluminiscens løsninger ((reagent 1+reagent 2) ECL Western blotting analysis system fremkallingsvæske) fra kjøleskapet og tilsatte 1 ml av hver av disse i et glassrør med sølvfolie rundt. Blandet disse godt sammen og brukte pipette til å dekke hele membranen med denne løsningen, lot dette stå i ca 5 min og deretter tok vi bilder av membranen med kameramaskin(finn navnet på dette). Lagret bildene som tiff filer.

Senere analyserte vi disse bildene og sammenlignet de forskjellige prøvene mht deres ekspresjon av RKIP, NSE og Aktin.

Diskusjon:

Målet med dette forsøket var å identifisere interessante proteiner som er uttrykt i de ikke-hormon produserende hypofysesvulstene. Dette ble gjort ved å kjøre 2D-gelelektroforese av prøver fra 18 ikke-hormon produserende hypofysesvulster.

Tilsammen 20 gelbiter fra 2D-PAGE ble sendt PROBE Proteomic unit ved universitetet i Bergen for identifisering av protein innhold. Gelbitene var farget med Coomassie Blue.

Da analyse svarene kom tilbake fra Bergen, bestemte vi oss for å se litt nærmere på særlig to interessante proteiner. Raf Kinase Inhibitory Protein (RKIP) og Neuron Spesific Enolase (NSE).

Raf kinase inhibitory protein (RKIP):

I de senere årene har interessen for RKIP økt betraktelig pga oppdagelsen om dets evne til innflytelse på den intracellulære signaliserende kaskaden, RKIP binder seg til Raf-1 og hindrer aktivering av ekstracellulært regulert kinase (ERK) kaskaden. Fosforyleringen av

RKIP av protein kinase C spalter RKIP fra Raf-1, stimulerer dets binding til og inhibering av G-protein koblede reseptor kinase 2 (GRK2).

Denne spaltingen øker signalisering ved aktivering av ERK-signalveien og reduserer reseptor desensibilisering.

RKIP spiller også en viktig rolle i celle syklusreguleringen og hemmingen av kreftmetastasing.

Neuronspesifikk enolase (NSE):

NSE er et normalt intracellulært enzym i neuralrørsderiverte celler, og finnes i nerveceller både i det perifere og det sentrale nervesystem. NSE fungerer som tumormarkør ved svulster som har utgått fra slike neuralrørsderiverte celler. Viktigst er småcellet lungekreft, hvor denne markøren brukes til å følge (den forbigående) effekten av cytostatikabehandling. Svulster av neuroendokrin opprinnelse og neuroblastomer gir høye NSE-verdier, og ved metastaserende maligne melanomer ser vi også hyppig høye verdier. Dette kan ha praktisk interesse for å følge sykdomsutviklingen. En del sjeldne tumores som for eksempel Wilms tumor kan gi forhøyede NSE verdier.

Det vi syntes var meget interessant var RKIP's evne til å virke hemmende på kreftmetastasing. De ikke hormon-produserende hypofysesvulstene gir sjeldent fjern metastase, muligens kan høyt innhold av RKIP hemme svulstene i å metastasere.

Vi ville videre vurdere om NSE nivået i serum kunne brukes til å bestemme hvilke pasienter med ikke-hormon produserende hypofyse-svulster som kunne ha en mer aggressiv tumor.

Dette forutsatte at det var korrelasjon mellom RKIP og NSE.

For å avgjøre dette kjørte vi western blot mht RKIP og NSE ekspresjon i disse tumorprøvene.

Resultatene av western blot av disse prøvene viste videre ingen klar korrelasjon mellom RKIP og NSE. Dette indikerer at NSE i serum ikke kan brukes som markør for RKIP-mengden i disse ikke-hormonproduserende hypofysesvulstene.

En av doktorgrads stipendiatene i vår forskningsgruppe, S.Fougner, valgte videre å se nærmere på RKIP i veksthormonproduserende hypofysesvulster, hvor jeg bla. bidro med

kjøring av western på disse pasientprøvene. Dette prosjektet ble publisert i ”The journal of clinical endocrinology & metabolism. Low adenoma levels of Raf kinase inhibitory protein (RKIP) correlate to poor octreotide response in acromegaly (1.).

Bibliografi:

1. Fougner SL, Bollerslev J, Latif F, Hald JK, Lund T, Ramm-Pettersen J, Berg JP. Low adenoma levels of Raf kinase inhibitory protein (RKIP) correlate to poor octreotide response in acromegaly. J Clin Endocrinol Metab. In press
2. Greenman, Melmed S. Diagnosis and management of non-functioning pituitary tumors, Annual review of medicine.1996; 47: 95-106
3. Asa, Ezzat. 1998. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas Endocrine Reviews. 1998; 19 (6): 798-827.
4. Evans et al 2003
5. Herman et al Clonal origin of pituitary adenomas J Clin Endocrinol Metab. 1990 ;71:1427-33.
6. Bollerslev J Akromegali - diagnostikk og behandling Tidsskr Nor Lægeforen 2000; 120:2534-8.
7. Svartberg J, Carlsen S, Cappelen J, Aanderud S, Johansen M, Schreiner T, Kollevold T, Bakke S, Bollerslev J Hyperprolaktinemi og prolaktinom - utredning og behandling, Tidsskr Nor Lægeforen 2002; 122:494-8
8. Evang J, Carlsen S, Svartberg J, Aanderud S, Johannesen Ø, Schreiner T, Ramm-Pettersen J, Bakke S, Lund-Johansen M, Bollerslev J Endogent Cushings syndrom, Tidsskr Nor Lægeforen 2006; 126:599-602
9. Khan A N, Turnbull, Rudralingam, Alonso, Musda, James, Munusamy Pituitary adenoma www.Emedicine.com.
10. Osa EL, Horjen J, Aanderud S, Lund-Johansen M Operativ behandling av hormonproduserende hypofyseadenomer Tidsskr Nor Lægeforen 2006 126:1330-2.
11. Chomczynski, Sacchi Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction Analytical Biochemistry 1987; 162; 156-159.
12. Chomczynski A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples Biotechniques 1993; 15:532-4.
13. Life technologies, Trizol Reagent, Protein precipitation
14. Bio-Rad protein assay, Protein concentration measurement based on the Bradford metod. www.Biorad.com.
15. Compton, Jones Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay Analytical Biochemistry 1985; 151;369-74.

16. Adessi et al. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients *Electrophoresis* 1997 ;18:127-35.
17. Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images *Appl Microbiol Biotechnol* ; 2007; 76:1223–1243.
18. Klysik, Theroux SJ, Sedivy JM, Moffit, Boekelheide *Cellular signalling* 2008; 20:1-9.
19. Gonzalez L, Bustamante JJ, Barea-Rodriguez 2-D native-PAGE/SDS-PAGE visualization of an oligomer's subunits: application to the analysis of IgG. *Electrophoresis* 2006; 27:2016-23.